

Die autologe "Mixed Lymphocyte Reaction"
bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

von
Ottmar Leidner
aus
Kötzing

1401

1001 # 2 33

Aus dem Institut mit Poliklinik
für klinische Immunologie und Rheumatologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. J. R. Kalden

Die autologe "Mixed Lymphocyte Reaction" bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Ottmar Leidner
aus
Kötzing

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. med. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. med. J. R. Kalden
Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.1981

Meinem Vater und meiner Frau
in Dankbarkeit gewidmet

Häufig verwendete Abkürzungen:

MLC	(allogene) "Mixed Lymphocyte Culture"
MLR	(allogene) "Mixed Lymphocyte Reaction"
AMLC	autologe "Mixed Lymphocyte Culture"
AMLR	autologe "Mixed Lymphocyte Reaction"
RA =	Rheumatoide Arthritis =
pcP	progressiv chronische Polyarthrits
T	Thymus-Lymphozyten-Fraktion, definiert als mit Schafererythrozyten rosettierend
Non-T	Nicht-Thymus-Lymphozyten-Fraktion, definiert als nicht mit Schafererythrozyten rosettierend
SI	Stimulationsindex, -indices
cpm	Zähler je Minute = "counts per minute"

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Lymphozytenspender	3
2.2.	Isolation peripherer Blutlymphozyten	4
2.3.	Trennung in T- und Non-T-Lymphozyten	5
2.4.	Durchführung der "Mixed Lymphocyte Culture"	6
2.5.	Analyse der Lymphozytenmarker	9
2.6.	Auswertung	11
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Autologe "Mixed Lymphocyte Reaction"	12
3.2.	Umkehrung der AMLR	15
3.3.	Allogene "Mixed Lymphocyte Reaction"	16
3.4.	Analyse der Lymphozytenmarker	19
3.5.	AMLR, Alter und Geschlecht	20
3.6.	AMLR und Krankheitsdauer	21
3.7.	AMLR, klinische und Laborbefunde	21
3.8.	AMLR und Medikation	23
4.	Diskussion	28
5.	Zusammenfassung	37
6.	Literaturverzeichnis	39

1. Einführung

Seit 1963 ist bekannt, daß mononukleäre Leukozyten verschiedener Spender sich in vitro gegenseitig zu blastoiden Zellen umformen, zu DNS-Synthese und Proliferation anregen (1).

Mittlerweile gilt als sicher, daß diese "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR) ein in-vitro-Modell der Transplantatabstoßung und der "Graft-versus-Host-Reaktion" bei der Transplantation immunkompetenter Zellen darstellt, also der allogenen zellulären Immunität in vivo entspricht (2).

Seit 1975 zeigten in-vitro-Experimente, daß eine gleichartige Reaktion auch zwischen Lymphozytensubpopulationen ein- und desselben Spenders stattfindet (8,9). In dieser "autologen Mixed Lymphocyte Reaction" (AMLR) werden wie in der allogenen MLR T-Lymphozyten durch Non-T-Lymphozyten stimuliert (8-12 u.v.a.).

Untersuchungen über die Aktivierung unterschiedlicher immunologischer Effektormechanismen im Rahmen der AMLR lassen vermuten, daß die AMLR eine Grundreaktion des immunregulatorischen Steuer- oder Regelkreises in vivo ist (9,11,13,14,).

Bei der "primär chronischen Polyarthrititis" (pcP) oder "Rheumatoiden Arthritis" (RA) sind verschiedene T-Zell-vermittelte wie humorale Immunmechanismen alteriert (15,16).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sollen daher Aufschluß darüber erbringen, ob die AMLR bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis verändert ist und ob sich das Ergebnis mit anamnestischen, klinischen oder laborchemischen Parametern in Beziehung bringen läßt.

Eine verringerte AMLR wurde bereits bei Patienten mit "systemischem Lupus Erythematodes" (SLE), bei dem wie bei der RA eine Autoimmunpathogenese diskutiert wird, beschrieben und untersucht (11,14,17,18).

2. Material und Methoden

2.1. Lymphozytenspender

Als Blutspender stellten sich 16 Patienten mit "weitgehend gesicherter pcP" (mindestens vier Kriterien der "American Rheumatism Association") von mindestens sechs Monaten Dauer und 17 gesunde Kontrollpersonen zur Verfügung.

Die Kollektive differierten in Alter und Geschlecht:

RA-Patienten:	15 weiblich, 1 männlich Alter von 29 bis 73 Jahren, im Mittel 54,6 Jahre
Kontrollpersonen:	7 weiblich, 10 männlich Alter von 20 bis 58 Jahren, im Mittel 32,8 Jahre

Daher blieb zu prüfen, ob die Höhe der AMLR krankheitsunabhängig mit Alter oder Geschlecht in Beziehung steht.

Außer in zwei Fällen wurde in jedem Versuch ein Patient und eine Kontrollperson gleichzeitig untersucht.

2.2. Isolation der Lymphozyten aus peripherem Blut

Ziel der Isolation war die sterile Gewinnung einer sogenannten "FFF"-Fraktion (Ficollgradient - Ferrophagozytose - Falconadhärenz) (19).

Dazu wurden 150 ml venöses Blut in Erlenmeyer-Glas-
kolben mit Glaskügelchen 15 Min. zur Defibrinierung
geschüttelt. Um die phagozytierenden Zellen zu binden,
wurden 80 ml "Lymphocyte Separating Reagent" (kolloid
gelöstes Eisen, Technicon Instruments, T 01-0507) und
200 ml Phosphatpuffer (PBS) zugegeben (9,19). Diese
Mischung wurde erneut 30 Min. geschüttelt und 45 Min.
bei 37 °C in Gewebekulturflaschen (Costar 3150) inkubi-
ert. Durch vorsichtiges Abgießen wurden dann die
plastikadhärenten Zellen eliminiert.

Je 20 ml des Überstands wurden über 15 ml Ficoll-
Hypaque (Flow Lab., 16-920-49) geschichtet und 20 Min.
bei 15 °C und 400 g zentrifugiert (20).

Der lymphozytenreiche Monolayer wurde vorsichtig abge-
hebert und nach Verdünnung mit PBS bei 450 g abzentrifugiert. Verunreinigende Erythrozyten wurden durch
hypotone Lyse in 0,83%iger Ammoniumchloridlösung be-
seitigt. Anschließend wurden die Lymphozyten in Kul-
turmedium "M 199" (aus Rohmedium Flow Lab. 14-231-54)
gewaschen, in der Neubauerkammer gezählt und auf eine
Konzentration von 5×10^6 Zellen je ml eingestellt.

2.3. Trennung der Lymphozyten in T- und Non-T-Zellen

Zur sterilen Separation wurde die Rosettierung der T-Lymphozyten mit Schafererythrozyten ("sheep red blood cells", SRBC) verwendet. Schafblut, defibriniert (BAG 3004), wurde dreimal in 0,9%iger Kochsalzlösung und zweimal in M 199 gewaschen.

Je 0,5 ml des SRBC-Sediments wurden mit 0,05 U Neuraminidase (Behring ORKD 04/05, *Vibrio cholerae*) behandelt (21), 30 Min. bei 37 °C inkubiert, dann zweimal in M 199 gewaschen und auf eine Konzentration von 0,2 ml SRBC je 10 ml Suspension eingestellt (22).

Je 10 ml der SRBC-Suspension wurden mit je 10 ml der Lymphozytensuspension vermischt, 5 Min. bei 37 °C inkubiert, 5 Min. bei 200 g zentrifugiert und 3-4 Stunden bei 4 °C gekühlt. Dann wurden die Pellets vorsichtig aufgeschüttelt und je 20 ml der Suspension mit 15 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation, 20 Min. bei 400 g, wurde die unrosettierte, Non-T-Zell-reiche Fraktion im Monolayer abgehebert, mit PBS verdünnt und abzentrifugiert, mit 0,83%iger Ammoniumchloridlösung gereinigt, mit M 199 gewaschen und gezählt.

Die rosettierte, T-Zell-reiche Fraktion im Pellet wurde genauso behandelt.

Trotz der Kombination von Phagozytose, Plastikadhärenz und Ficollgradient konnten Monozyten und poly-

morphkernige Leukozyten (PML) nie völlig eliminiert werden. Der Anteil an monozytoiden Zellen lag in allen Populationen bei etwa 1-3 %, der an PML streute von 0 % in den T-Fraktionen bis maximal 8 % in den Non-T-Fraktionen.

2.4. Durchführung der "Mixed Lymphocyte Culture"

Die Kulturen wurden als sogenannte "Einweg"-MLC (23) angesetzt. Dabei steht eine proliferationsfähige Responderpopulation einer nicht proliferationsfähigen Stimulatorpopulation gegenüber. Ein Teil der Lymphozytenfraktionen wurde mit einem Mitosehemmstoff behandelt: Dazu wurden je 10^6 Lymphozyten mit $100 \mu\text{g}$ Mitomycin C (Carl Roth, Karlsruhe, 4150) 30 Min. bei 37°C inkubiert, dreimal in M 199 gewaschen, gezählt und in M 199 mit 15 % hitzeinaktiviertem Humanserum der Blutgruppe AB (ABS) (von freiwilligen Spendern oder Gibco-BioCult 200-6152) auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen je ml eingestellt. Die Effektivität der Mitomycinbehandlung wurde in mehreren Tests geprüft: Kulturen mitomycinbehandelter Zellen lagen stets im Streubereich nicht ^3H -Thymidinmarkierter Kulturen.

Ein anderer Teil der Lymphozytenfraktionen wurde als Responderpopulation ohne Mitomycin auf 10^6 Zellen je ml M 199 mit 15 % AB-Serum eingestellt.

Alle Zellfraktionen wurden Minuten vor dem Ansatz der

Kultur mit Trypanblau auf den Anteil an toten Zellen untersucht. Der lag meist bei 2 %, stets unter 6 %. Die damit gewonnenen Suspensionen wurden nach folgendem Schema in Kultur gegeben:

	Stimulatorzellen mitomycinbehandelt	Responderzellen
Autologe MLC	Non-T - RA	T - RA
	Non-T - Ko	T - Ko
Umkehrung als Gegenkontrolle	T - RA	Non-T - RA
	T - Ko	Non-T - Ko
Allogene MLC	Non-T - RA	T - Ko
	Non-T - Ko	T - RA
Bezugskulturen	-	Non-T - RA
	-	Non-T - Ko
	-	T - RA
	-	T - Ko

Tab. 1: Schema der MLC bei RA-Pat. und Gesunden (Ko)

Die einzusetzenden Zellzahlen wurden in Dosis-Antwort-Versuchen bei zwei Patienten und zwei Kontrollpersonen ermittelt. Ein Stimulator/Responder-Verhältnis von 2 : 1 oder 4 : 1 zeigte dabei die größte Trennschärfe. Abb. 1 zeigt ein Beispiel:

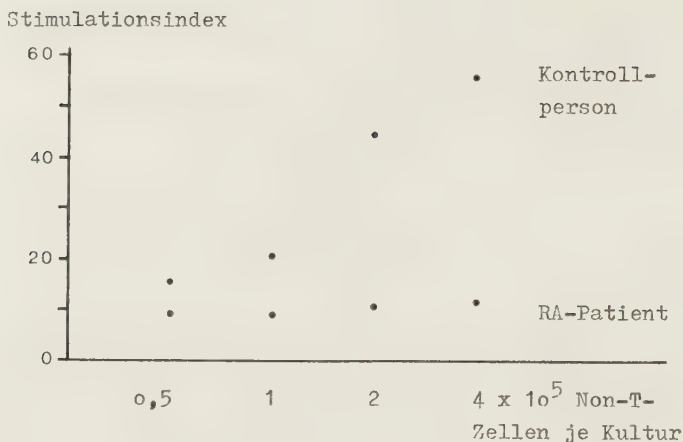


Abb. 1: Dosis-Antwort-Beziehung der AMLR in SI

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden in jedem Versuch Kulturen mit 2×10^5 , meist auch mit 4×10^5 Stimulatorzellen angesetzt. Die Zahl der Responderzellen betrug in jeder Kultur 1×10^5 .

Die MLC wurden als Triplicate in Mikrottestplatten (Falcon Plastics 3040) angesetzt (24) und bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxyd bebrütet.

120 Stunden nach Ansatz wurden die Kulturen mit je $1 \mu\text{Curie}$ Tritium-markiertem Thymidin (Amersham-Buchler) beimpft. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet (Flow Lab., Titertek Cell Harvester), die Glasfaserplättchen mit 10 ml Scinti-Gel (Roth 2-5318) überschichtet und im Szintillationszähler gemessen (Packard Tricarb Scintillation Counter).

2.5. Analyse der Lymphozytenmarker

Alle bei der Separation entstandenen Lymphozytenfraktionen wurden untersucht (25) auf

- Oberflächenimmunglobulin (Surface Ig, SIg)
- Rezeptoren für Schaferythrozyten (SRBC)
- Rezeptoren für Fc-Teile von Immunglobulinen (Fc)
- Rezeptoren für Complementfaktor 3 (C_3).

Fluoreszenzoptischer Nachweis von Oberflächen -
Immunglobulin

Ein Pellet von ca. 10^6 Lymphozyten wurde mit 300 μ l einer 1 : 4 - Verdünnung von fluoreszeinmarkiertem Anti-Human-Immun-globulin (IgG, IgA und IgM) von der Ziege (Behring OTKG 04/05) 30 Min. bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert, dann dreimal in M 199 gewaschen. Im Fluoreszenzmikroskop wurde der Anteil an SIg-positiven Zellen ermittelt, gezählt wurden mindestens 300 Zellen.

SRBC-Rosettierung zum Nachweis von SRBC-Rezeptoren (22)

Schafblut, defibriniert, wurde dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Je 20 μ l des SRBC-Sediments wurden in 5 ml M 199 aufgenommen, mit 0,05 U Neuroaminidase 30 Min. bei 37 °C inkubiert, zweimal in M 199 gewaschen und in 1 ml M 199 suspendiert. Je 0,25 ml dieser Suspension wurden mit ca. 10^6 Lympho-

zyten gemischt, 5 Min. bei 37 °C inkubiert, 5 Min. bei 200 g zentrifugiert und ca. 12 Stunden bei 4 °C gekühlt. Dann wurde das Pellet mit Acridin-Orangelösung aufgeschüttelt und unter dem UV-Mikroskop der Anteil an rosettierten Zellen ermittelt. Als Rosettierung galt die Anlagerung von drei und mehr Erythrozyten, gezählt wurden mindestens 200 Zellen.

Rosettierungen zum Nachweis von Fc- und C₃-Rezeptoren

Fc-Rezeptor-tragende Zellen können durch ihre Affinität zu Erythrozyten-Antikörper-Komplexen (EA) nachgewiesen werden, C₃-Rezeptor-tragende durch ihre Affinität zu Erythrozyten-Antikörper-Complement-Komplexen (EAC).(25)

Dazu wurde frisches Rinderblut dreimal in polyionischem Puffer (PIS) gewaschen und je 0,1 ml der Rindererythrozyten (bovine red blood cells, BRBC) in 2 ml PIS suspendiert.

Durch Antestung wurden optimale Verdünnungen eines Anti-BRBC-Serums von Kaninchen ermittelt.

Zur Herstellung des EA-Komplexes wurden 2 ml der dafür optimalen Anti-BRBC-Serumverdünnung mit 2 ml der BRBC-Suspension eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der EA-Komplex zweimal in PIS gewaschen und in 2 ml PIS aufgenommen. Zur Herstellung des EAC-Komplexes wurde die dafür optimale Anti-BRBC-Serumverdünnung gewählt und wie oben mit BRBC inkubiert und

gewaschen. Dann wurde die Suspension mit 2 ml einer 1:20-Verdünnung von frischem Humanserum der Blutgruppe AB eine Stunde bei 37 °C inkubiert, zweimal in PIS gewaschen und in 2ml PIS aufgenommen.

300 μ l des EA- wie des EAC-Komplexes wurden mit je ca. 10^6 Lymphozyten gemischt; rosettiert und ausgewertet wurde wie bei der SRBC-Rosettierung.

EA-rosettierende Zellen wurden als Fc-Rezeptor-positiv gewertet, EAC-rosettierende als C₃-Rezeptor-positiv.

2.6. Auswertung

Die proliferative Aktivität der MLC's wird über die Menge des inkorporierten Tritiums gemessen. Die Höhe der MLR wird somit entweder direkt in radioaktiven Zerfällen pro Zeiteinheit (counts per minute, cpm) oder im sogenannten Stimulationsindex (SI) ausgedrückt, dem Quotienten aus den cpm der stimulierten Kultur, dividiert durch die cpm der entsprechenden unstimulierten Kontrollkultur, die nur den Responder enthält.

Da die vorliegenden Daten die Anforderungen des t-Tests nicht sicher erfüllen, wurde die Prüfung der Irrtumswahrscheinlichkeit nach dem non-parametrischen Verfahren von Wilcoxon, Mann und Whitney (MMW) vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Die autologe "Mixed Lymphocyte Reaction"

Werden mitomycinbehandelte Non-T-Lymphozyten mit autologen T-Lymphozyten kultiviert, proliferieren die T-Zellen. Wenn diese "Einweg-AMLR" zwischen Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) und gesunden Kontrollpersonen (Ko) verglichen wurde, zeigten sich die in Abb. 2 und 3 halblogarithmisch dargestellten Unterschiede.

Bei Verwendung von 2×10^5 Non-T-Lymphozyten als Stimulator- und 1×10^5 T-Lymphozyten als Responderzellen, betrug die AMLR von RA-Patienten im Mittel

4666 cpm (Standardabweichung, S.dev. = 5583 cpm).

Demgegenüber zeigen Gesunde eine AMLR von im Mittel

12085 cpm (S.dev. = 8420 cpm).

Dieser Unterschied ist nach WMW signifikant mit

$$\alpha < 0,002.$$

Abb. 3 stellt die gleichen AMLR in Stimulationsindices dar. RA-Patienten zeigen SI von im Mittel

15,7 (S.dev. = 17,7), die SI gesunder Kontrollpersonen streuen um den Mittelwert

36,3 (S.dev. = 29).

Die Signifikanzprüfung nach WMW ergibt

$$\alpha < 0,05.$$

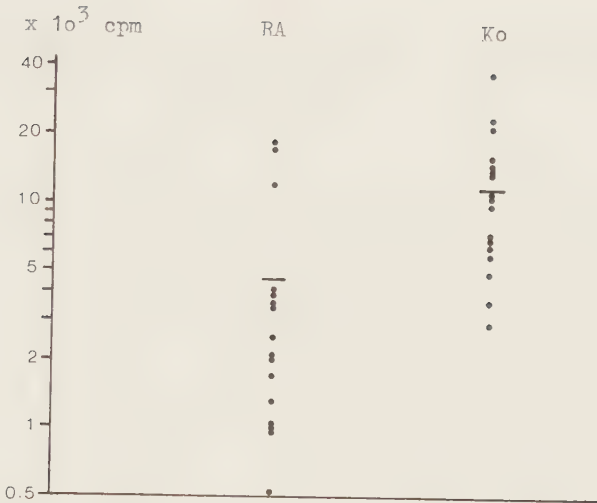


Abb. 2: AMLR von 16 RA-Pat. und 17 Gesunden in cpm bei 2×10^5 Stimulatorzellen (halblogarithmisch)

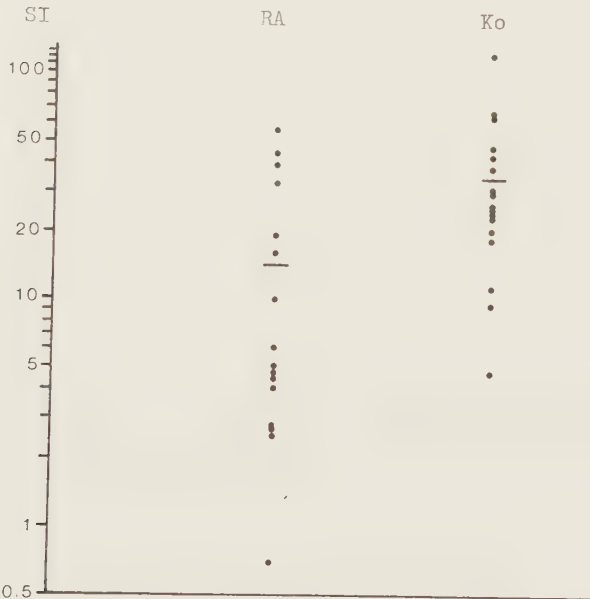


Abb. 3: AMLR von 16 RA-Pat. und 17 Gesunden in SI bei 2×10^5 Stimulatorzellen (halblogarithmisch)

Somit weisen Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu Gesunden eine signifikant verringerte autologe "Mixed Lymphocyte Reaction" auf.

Bei 7 Patienten und 10 Kontrollpersonen wurde die AMLR mit verdoppelter Stimulatorzellzahl (4×10^5 Non-T-Lymphozyten) untersucht. Die gewonnenen Testergebnisse, in Abb. 4 und 5 halblogarithmisch dargestellt, ergaben ebenfalls eine signifikante Verringerung der AMLR bei RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

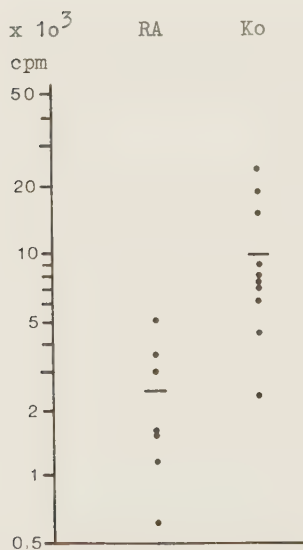


Abb. 4 : AMLR in cpm bei
 4×10^5 Stimulatorzellen

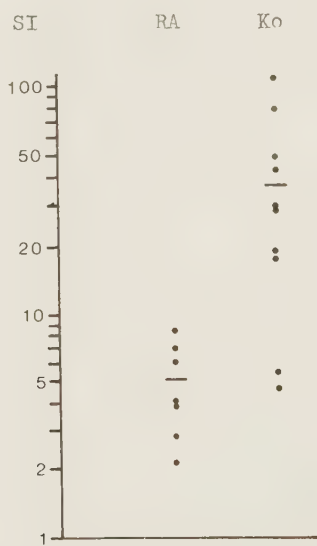


Abb. 5 : AMLR in SI bei
 4×10^5 Stimulatorzellen

3.2. Umkehrung der autologen "Mixed Lymphocyte Reaction"

Um die Trennschärfe der Lymphozytenseparation zu überwachen und die Identität von Stimulator- und Responderzellen zu sichern, wurde in allen Versuchen geprüft, ob mitomycinbehandelte T-Lymphozyten einen Einfluß auf das Wachstum proliferationsfähiger Non-T-Lymphozyten ausüben. Dabei ergab sich in fast allen Fällen ein Stimulationsindex unter 1. T-Lymphozyten haben also in der AMLC ebenso wie in der allogenen MLC keine stimulierende Wirkung. In etwa einem Drittel der Fälle konnte sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden:

Steigende Konzentrationen an mitomycinbehandelten T-Zellen erniedrigten die Proliferation der Non-T-Lymphozyten. Ein Beispiel:

"Stimulator" mitomycinbeh.	"Responder"	cpm	SI
-	1×10^5 Non-T	2425	1
1×10^6 T	1×10^5 Non-T	1714	0,71
2×10^5 T	1×10^5 Non-T	1323	0,55
4×10^5 T	1×10^5 Non-T	692	0,28

Tab. 2a : Umkehrung der AMLR

Häufiger war jedoch keine Dosisabhängigkeit erkennbar, zum Beispiel:

"Stimulator" mitomycinbeh.	"Responder"	cpm	SI
-	1 x 10 ⁵ Non-T	1246	1
1 x 10 ⁵ T	1 x 10 ⁵ Non-T	171	0,14
2 x 10 ⁵ T	1 x 10 ⁵ Non-T	185	0,15
4 x 10 ⁵ T	1 x 10 ⁵ Non-T	227	0,18

Tab. 2b : Umkehrung der AMLR

Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen RA-Patienten und Gesunden, auch keine Korrelation zur Höhe der AMLR oder zur Verteilung Fc-Rezeptor-positiver Zellen.

3.3. Die allogene "Mixed Lymphocyte Reaction"

Parallel zur AMLR wurde in den meisten Versuchen das allogene Verhalten der Lymphozytenfraktionen geprüft. Die Ergebnisse der alloge- nen MLR unter Verwendung von 2 x 10⁵ Non-T-Lymphozyten und 1 x 10⁵ alloge- nen T-Zellen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt:

Stimulator (Mitomycin)	Responder	cpm	SI	n
Non-T-Ko	T-Ko	78345 ± 44533	208 ± 49,8	4
Non-T-Ko	T-RA	43613 ± 21539	124 ± 71,9	12
Non-T-RA	T-Ko	29449 ± 21911	91 ± 59,2	12

Tab. 3: Allogene MLR zwischen RA-Patienten (RA) und gesunden Kontrollpersonen (Ko)

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, sind bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis die Non-T-Lymphozyten in ihrer allogenen Stimulationskraft geschädigt (für cpm $\alpha < 0,01$, für SI $\alpha < 0,2$). Weiterhin legen die gewonnenen Ergebnisse eine verminderte Reaktivität von RA-T-Lymphozyten auf einen allogenen Stimulus nahe, wobei jedoch nur für die cpm eine signifikant verminderte T-Zell-Reaktivität gefunden wurde, nicht für die SI (nicht signifikant). Eine Aufstellung der einzelnen Ergebnisse der allogenen MLC, unter Verwendung von 2×10^5 bzw. 4×10^5 mitomycinbehandelten Non-T-Zellen und 1×10^5 allogenen T-Zellen geben Abb. 6 (in cpm) und 7 (in SI).

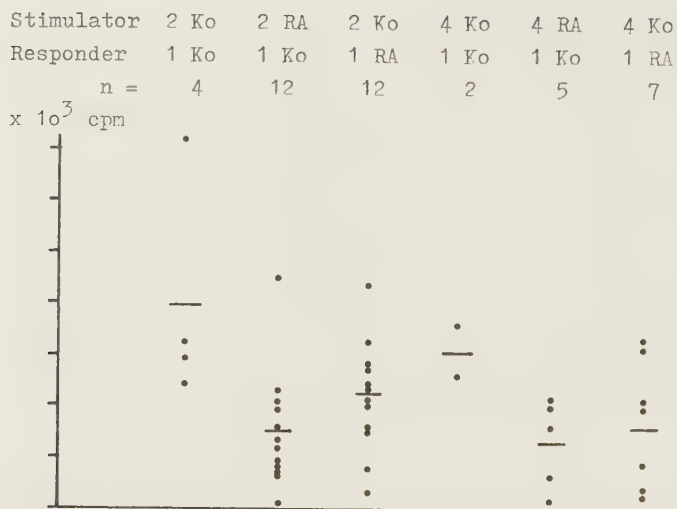


Abb. 6: Allogene MLR zwischen RA-Patienten (RA) und gesunden Kontrollpersonen (Ko) in cpm

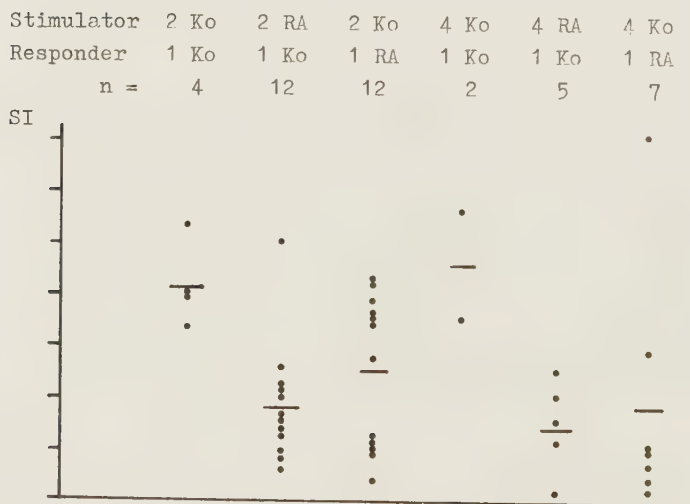


Abb. 7: Allogene MLR zwischen RA-Patienten (RA) und gesunden Kontrollpersonen (Ko) in SI

3.4. Analyse der Lymphozyten-Oberflächenmarker

Die Analyse der Lymphozytenfraktionen auf Oberflächenmarker erbrachte für keine der untersuchten Lymphozytensubpopulationen einen signifikanten Unterschied zwischen RA-Patienten und Gesunden, also auch keine Korrelation zur Höhe der AMLR. Tab. 4 zeigt die Ergebnisse der Markeranalyse.

"SRBC+"	rosettierten mit Schafererythrozyten
"EA+"	rosettierten über Fc-Rezeptoren mit Erythrozyten-Antikörper-Komplex
"EAC+"	rosettierten über C ₃ -Rezeptoren mit Erythrozyten-Antikörper-Complement-Komplex
"Sig+"	lagerten fluoreszein-markiertes Anti-Human-Globulin an

		SRBC+	EA+	EAC+	Sig+
RA-Pat. n = 16	FFF	66 ± 10	17 ± 4	19 ± 3	7 ± 3
	Non-T	8 ± 3	30 ± 6	33 ± 8	34 ± 11
	T	90 ± 4	7 ± 3	8 ± 3	0,8 ± 0,5
Gesunde n = 17	FFF	60 ± 14	18 ± 4	23 ± 6	9 ± 5
	Non-T	6 ± 5	30 ± 6	29 ± 4	38 ± 14
	T	91 ± 3	7 ± 2	7 ± 3	1 ± 0,7

Tab. 4: Verteilung der Lymphozytenmarker im peripheren Blut von RA-Patienten und Gesunden in Prozent. "FFF" steht für die ungetrennte, "Non-T" für die nicht mit SRBC rosettierende, Non-T-Zell-reiche Fraktion, "T" für die T-Zell-reiche, mit SRBC rosettierende Fraktion

3.5. AMLR, Alter und Geschlecht

Da die untersuchten Kollektive in Alters- und Geschlechtsverteilung stark verschieden waren, wurde untersucht, ob die Höhe der AMLR innerhalb der Kollektive mit Alter oder Geschlecht in Beziehung steht. Bei den weiblichen Kontrollpersonen ($n = 7$) betrug die AMLR (SI) im Mittel 35,6 (S.dev. = 22,1), bei den männlichen ($n = 10$) im Mittel 37,6 (S.dev. = 34). Eine Geschlechtsabhängigkeit der AMLR ist somit äußerst unwahrscheinlich.

Die vorliegenden Daten lassen auch keinerlei Hinweis auf eine "physiologische" Abnahme der AMLR mit dem Alter erkennen (Abb. 8).

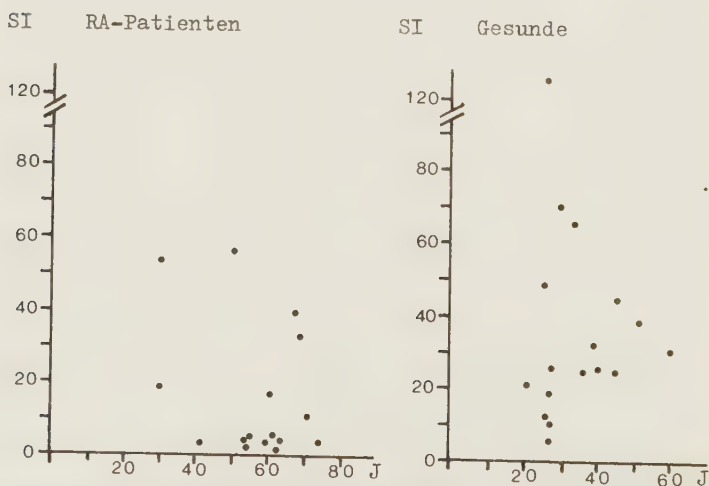


Abb. 8: Altersabhängigkeit der AMLR in SI bei

16 RA-Patienten und 17 Gesunden

3.6. AMLR und Krankheitsdauer

Die Überprüfung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der Höhe der AMLR und der anamnestischen Dauer der RA erbrachte kein auffälliges Ergebnis (Tab. 5).

AMLR (ST)	0,7	2,5	2,6	2,2	4,2	4,5	4,5	5,1
RA-Jahre	10	10	10	7	1/2	3/4	20	2

AMLR (SI)	5,9	10,3	16,4	19	32,3	38,8	45	56,4
RA-Jahre	2	10	30	1	20	4	1	3

Tab. 5: Abhängigkeit der AMLR von der Dauer der RA

3.7. AMLR, klinische und Laborbefunde

Die Ergebnisse der AMLC in Korrelation zu den diagnostischen Kriterien der "American Rheumatism Association", dem Auftreten der Rheumafaktoren, zu Entzündungszeichen wie Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) und Bluteiweiß-Elektrophorese (α_2 -Globulin), zum weißen Blutbild und zum klinischen Stadium nach Steinbrocker et al. sind in Abb. 9 dargestellt. Wie die Aufstellung zeigt, sind signifikante Zusammenhänge nicht erkennbar.

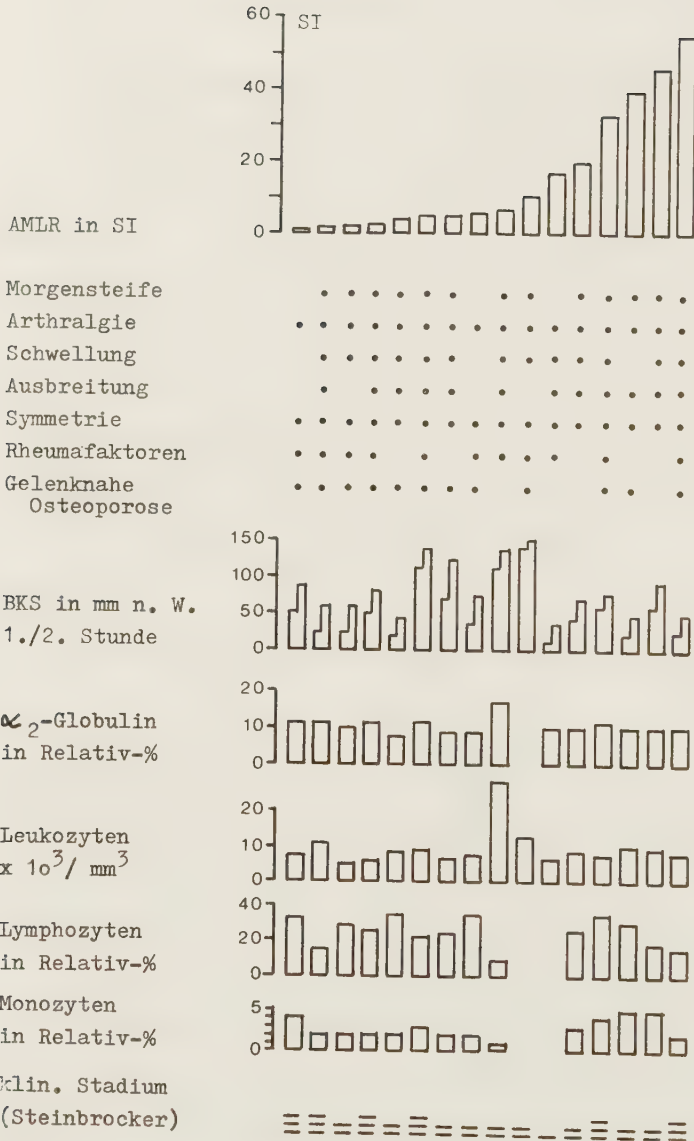


Abb. 9: AMLR, klinische und Laborbefunde bei RA

3.8. AMLR und Medikation

Aufgrund der Medikation der Patienten zum Zeitpunkt der Analyse der AMLR ließen sich folgende Gruppen unterteilen:

Steroidale (s) und nichtsteroidale (n) Antirheumatika, Goldsalze (g) und d-Penicillamin (d).

Die Behandlung mußte mindestens eine Woche vor Kultur begonnen worden sein. Die Korrelation der unterschiedlichen Therapieschemata zum Ergebnis der AMLR (Abb. 10) erbrachte, daß von sieben RA-Patienten, deren AMLR (in SI) im Streubereich der gesunden Kontrollpersonen lag, sechs unter einer Behandlung mit Goldsalzen standen.

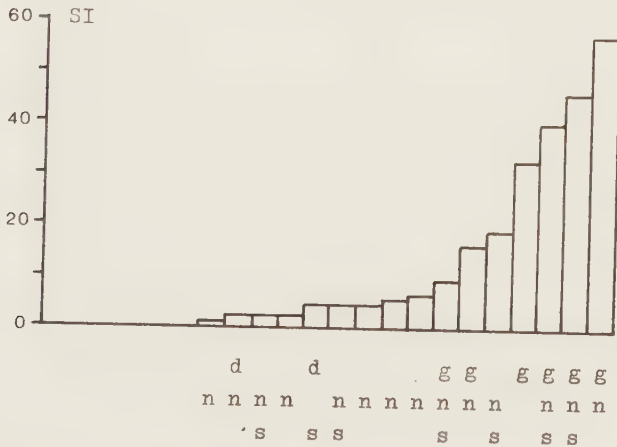


Abb. 10: Abhängigkeit der AMLR von der Medikation

Eine Beziehung zwischen der Dauer der Chrysotherapie und der Höhe der AMLR war jedoch nicht herzustellen. Selbst sehr kurze Behandlungszeiten von 1 bis 2 Wochen waren mit auffällig hoher AMLR verbunden (Tab. 6).

AMLR (SI)	10,3	16,4	32,3	38,8	45,0	56,4
Goldtherapie	12 M	2 Wo	1 Wo	18 M	3 M	2 Wo

Tab. 6: AMLR und Dauer der Goldbehandlung

Aufgrund dieser Befunde werden die gesamten Ergebnisse der AMLR aufgeschlüsselt in Patientengruppen mit Goldtherapie ("gold") und solche ohne Goldbehandlung ("nichtgold"). Die Ergebnisse finden sich in Abb. 11 (in cpm) und 12 (in SI) halblogarithmisch dargestellt (Tab. 7).

	cpm	SI
RA-nichtgold	1830 $\pm$ 1149	5,2 $\pm$ 5,1
RA-gold	9401 $\pm$ 6936	33,2 $\pm$ 17,4
Gesunde	12085 $\pm$ 8420	36,3 $\pm$ 29

Tab. 7: AMLR bei RA-Patienten mit und ohne Goldbehandlung und bei Gesunden

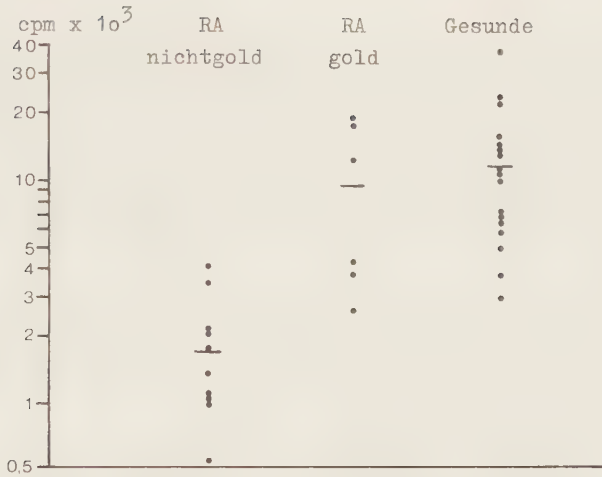


Abb. 11: AMLR von 10 RA-Patienten ohne und 6 RAP mit Goldtherapie und 17 Gesunden in cpm

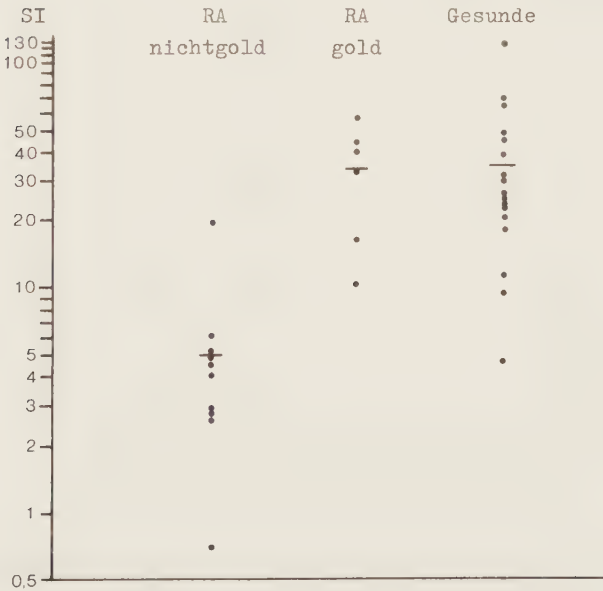


Abb. 12: AMLR von 10 RA-Patienten ohne und 6 RAP mit Goldtherapie und 17 Gesunden in SI

Der gefundene Unterschied zwischen goldbehandelten und nicht goldbehandelten RA-Patienten in der AMLR ist für cpm mit $\alpha < 0,005$ und für den SI mit $\alpha < 0,02$ signifikant, zwischen goldbehandelten Patienten und gesunden Kontrollpersonen besteht kein signifikanter Unterschied.

Parallel zur AMLR wurden auch die Ergebnisse der allogenen MLR in eine Gruppe goldbehandelter Patienten und eine Gruppe ohne Goldtherapie aufgeschlüsselt. Die Ergebnisse zeigt Tab. 8.

Stimulator (Mitomycin)	Responder	cpm	SI	n
Non-T-Ko	T-Ko	78345 ± 44533	208 ± 49,8	4
Non-T-Ko	T-RA-gold	75633 ± 16002	182,5 ± 9,2	2
Non-T-Ko	T-RA-nichtgold	37207 ± 16282	111,5 ± 72,7	10
Non-T-RA-gold	T-Ko	66332 ± 30750	165,6 ± 121	2
Non-T-RA-nichtgold	T-Ko	22073 ± 10908	76,1 ± 34,3	10

Tab. 8: Allogene MLC bei RA-Patienten mit und ohne Goldbehandlung und bei Gesunden

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, war bei nicht mit Gold behandelten Patienten die Non-T-Fraktion in

ihrer Stimulations-Kapazität deutlich geschädigt
(für SI wie für cpm $\alpha < 0,002$). Die T-Fraktion zeigte
dagegen nur eine nicht signifikant verminderte Reak-
tionskapazität (für cpm $\alpha < 0,02$, für SI ns).
Goldbehandelte Patienten reagieren wie Gesunde.

4. Diskussion

Mit der Entdeckung und Analyse der allogenen "Mixed Lymphocyte Reaction" wurde ein entscheidender zell-vermittelter und Monozyten-abhängiger Abwehrmechanismus des körpereigenen Immunsystems aufgedeckt (1). Untersuchungen zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen in den letzten Jahren zeigten parallel zur Aufdeckung der Reaktionsmechanismen in der "Mixed Lymphocyte Reaction", daß die von Burnet postulierte klonale Selektionstheorie als Erklärung für die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Substanzen nicht mehr gilt. Vielmehr wurden autoreaktive Lymphozyten im menschlichen Organismus gefunden, die bei in vitro-Kontakt mit unterschiedlichen autologen Zellpopulationen zur Proliferation angeregt wurden (3-7,26-28).

Die Arbeitsgruppen um Opelz und Weksler (8,9) demonstrierten als erste, daß isolierte Lymphozyten-Subpopulationen eines Individuums sich in vitro gegenseitig zu Wachstum und DNS-Synthese stimulieren, auch bei offenbar gesunden Spendern, womit die "autologe Mixed Lymphocyte Reaction" (AMLR) gefunden war. Die Identifizierung der an dieser AMLR beteiligten Zellfraktionen ist noch nicht abgeschlossen, besonders die Natur der stimulierenden Zellen ist noch unzureichend gesichert. Die meisten Autoren zählen sie zu den Immunglobulin-tragenden B-Lymphozyten (7,8,11,29).

auch K-Zellen (9) sowie eine T-Zell-Subpopulation (30) und Makrophagen-Monozyten (11) werden diskutiert. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten schließen jedoch T-Lymphozyten definiert durch spontane Rosettenbildung mit Schaeferythryten, als autologe wie allogene Stimulatoren in der gemischten Lymphozytenkultur weitgehend aus (s. Tab. 2). In den vorliegenden Untersuchungen war die stimulierende Fraktion, im Vergleich zu Literaturberichten über die allogene MLC, reich an Immunglobulin-positiven B-Lymphozyten (s. Tab. 4). Außerdem konnte in zwei Versuchen zusätzlich gezeigt werden, daß eine maximale Makrophagendepletion (durch erneute Ferrophagozytose und Ficoll-Gradienten) die gemessene Reaktivität in der AMLR deutlich senkte, von 8707 auf 2784 cpm sowie von 8928 auf 3907 cpm. Monozytoide Zellelemente sind nach diesen Ergebnissen, wie in der allogenen MLC und wie von Sakane et al. (11) auch für die AMLR gezeigt werden konnte, für eine normale Reaktivität notwendig. Unbestritten ist, daß die in der AMLR proliferierenden, autoreaktiven Responderlymphozyten (= autolog reaktive Zellen, ARZ) zu den thymusabhängigen "T"-Lymphozyten gehören (8,9,14,31). Diese T-Lymphozyten sind durch die spontane Erythrozytenbildung mit Schaeferythryten definiert. Die vorliegenden Daten bestätigen die Reaktivität der T-Zellen (s.S. 12) bei einer hohen Reinheit der T-Zell-Fraktion (s. Tab. 4). Der Versuch der funktionellen Einordnung der im Rahmen der AMLR aktivier-

ten ARZ erbrachte in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse: Zum einen konnte ein positiver Einfluß der ARZ auf die Immunglobulinsynthese autologer B-Lymphozyten-Populationen nachgewiesen werden, eine "Helfer"-Aktivität (32). Andererseits scheinen Thymus-lymphozyten aktiviert zu werden, die zytotoxisch auf verschiedene Target-Zellen wirken, auf autologe, Lipopolysaccharid-induzierte, Lymphoblasten (32), auf autologe wie allogene Mitogeninduzierte Blasten und Lymphoid-Zell-Linien und in geringerem Maße auch auf autologe Non-T-Zellen (34) sowie auf third-party-Antigene (10). Am deutlichsten konnten bislang Hinweise auf die Aktivierung von Suppressorzellen im Rahmen der AMLR erarbeitet werden (14,18,35-38), wobei die suppressorische Aktivität der ARZ sowohl durch die Hemmung zytotoxischer Reaktionen gegen Alloantigene (36) wie durch die Unterdrückung autologer "Plaque"-bildender Zellen (18) bestimmt wurde.

Ob der allogenen und der autologen MLR unterschiedliche antigene Stimulationsmechanismen zugrunde liegen oder ob unterschiedliche Stimulator- und Responderzellpopulationen aktiv sind, ist bis zum heutigen Tage nicht schlüssig beantwortet. Der Befund, daß sowohl die allogene wie die autologe MLR durch Antiseren gegen HLA-Dr-Antigene (Antigene, die mit dem "Ia-Antigen" bei Mäusen verglichen werden) blockierbar sind (42), weisen auf einen ähnlichen antigenen Stimulationsmechanismus in beiden Reaktionen hin. Andere Untersu-

chungen, besonders an Patienten mit SLE oder chronisch lymphatischer Leukämie, belegen, daß die autologe MLR über andere Antigen-systeme aktiviert wird als die allogene (11,40,41). Erste Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Stobo weisen deutlich auf eine monozytoide Subpopulation hin, die in der autologen, nicht aber in der allogenen MLR zur Stimulation der Thymuslymphozyten notwendig ist, während Studien anderer Arbeitsgruppen verdeutlichen, daß in der allogenen und in der autologen MLR unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen als Responderzellen aktiviert werden (38,39). Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern definierter Spezifität wird es vorbehalten bleiben müssen, mögliche unterschiedliche Stimulator- und Responderzell-Populationen in der allogenen und autologen MLR aufzudecken. Ob die AMLR ein Korrelat in vivo besitzt, bleibt noch fraglich. Die zitierten Untersuchungen über die Aktivierung von immunologischen Effektormechanismen im Rahmen einer AMLR in vitro legen jedoch die AMLR als einen zellulären Regulationsmechanismus mit zentraler Bedeutung sehr nahe (11). Diese Arbeitshypothese wurde zum einen durch den Nachweis gefestigt, daß die AMLR wie die allogene MLR die Immunattribute Spezifität und Gedächtnisfunktion besitzt (13), zum andern durch die Aktivierung von Helfer-, Killer- oder Suppressorlymphozyten in der AMLR (14,33,36), die zur "Surveillance" gegenüber veränderten körpereigenen Geweben beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals von einer gestörten AMLR in peripherem Blut von Patienten mit einer chronischen Polyarthrititis berichtet. Als Ursache für die gezeigten Befunde sind folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

Zum einen kann, wie bereits erwähnt, bei Patienten mit einer chronischen Polyarthrititis gegenüber Kontrollpersonen die Population der Responderzellen zahlenmäßig oder funktionell verändert sein. Die vorgenommene Marker-Analyse ergibt zwar darauf keinen Hinweis, doch ist zu einer Klärung dieser Möglichkeit der Einsatz von monoklonalen Antikörpern notwendig. Die Gruppe von Alarcón de Segovia zeigte wie erwähnt, daß eine Thymuszell-Subpopulation, die mit autologen Erythrozyten Rosetten bildet, die Responderzelle in der autologen MLC zu sein scheint (39), doch ist auch dieser Befund noch nicht als schlüssig anzusehen. Auch Fc(IgG)-Rezeptor-tragende T-Lymphozyten, für die in vitro eine Suppressorzellaktivität gezeigt werden kann, werden als geschädigte Subfraktion der Thymus-Lymphozyten diskutiert (14).

Zum anderen ist eine Störung der Stimulator-Zellfunktion zu diskutieren, wobei eine zahlenmäßige Abnahme unwahrscheinlich erscheint, da die Zugabe von Non-T-Zellen die AMLR bei SLE-Patienten nicht restituieren kann (11). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Stimulationskapazität der Non-T-Zellfraktion in der allogenen MLC (Tab. 3, Abb. 6/7) ist jedoch

nicht zwangsläufig auf dieselbe Stimulatorzell-Subpopulation zurückzuführen wie die verminderte AMLR. Daß Monozyten eine bedeutsame Rolle in der AMLC spielen, konnte unter anderem von der Arbeitsgruppe von Stobo et al. nachgewiesen werden. Die Daten auf S. 29 der vorliegenden Arbeit zeigen, daß eine Veränderung der Monozyten-Makrophagen durchaus als Ursache für eine Erniedrigung der AMLR in Betracht kommt. Schließlich sind für eine gestörte AMLR auch zellspezifische Auto-Antikörper, die zum Beispiel gegen HLA-Dr-Antigene auf Monozyten oder B-Lymphozyten gerichtet wären, als mögliche Ursache zu diskutieren.

Die Frage nach der pathogenetischen Bedeutung der verminderten AMLR bei Patienten mit einer chronischen Polyarthrititis muß noch weitgehend offen bleiben. Interessant sind jedoch Untersuchungen, die zeigen konnten, daß auch beim systemischen Lupus Erythematoses sowie bei der chronischen lymphatischen Leukämie eine erniedrigte AMLR gefunden wird, wobei die verminderte AMLR bei Patienten mit SLE zur Krankheitsaktivität korrelierbar ist (11,18,40,44-46). Als weitere Hinweise, die auf eine pathogenetische Verknüpfung zwischen erniedrigter AMLR und einer Störung der Immunregulation deuten, zeigten sich zum einen bei Patienten mit einem SLE zum andern bei NZB-Mäusen sowohl eine deutlich erniedrigte AMLR wie eine dazu parallel laufende Verminderung von Suppressorzell-Populationen

(30,47-51). Weiterhin konnte in Nabelschnurblut eine erhöhte Suppressorzellaktivität parallel zu einer gesteigerten AMLR aufgedeckt werden (13,52), und schließlich konnte die in der AMLR stimulierten Effektorzellpopulationen antigen-spezifisch als Suppressorzellen sowie zytotoxisch aktive Zellen definiert werden. Befunde von Innes (37) legen nahe, daß Concanavalin A und die in der AMLR stimulierenden Non-T-Lymphozyten die gleiche T-Zell-Subpopulation zur Proliferation anregen, da Antikörper gegen HLA-Dr-Antigen sowohl die AMLR wie die Stimulation von Suppressor-T-Lymphozyten durch Concanavalin A blockieren (42,53). Die beim SLE gefundene Parallelität zwischen einem Verlust von Suppressor-T-Zellen (14,16) und einer gestörten AMLR sowie die Befunde, daß Concanavalin A-induzierte Suppressor-T-Zellen in vitro die Immunglobulin-Synthese autologer B-Lymphocyten supprimieren, unterstützen ebenfalls die Hypothese einer zentralen Immunregulation durch die autologe AMLR.

Alle angeführten Befunde faßten Sakane und Mitarbeiter in einer bestechenden Arbeitshypothese zusammen (14), daß nämlich im Rahmen der AMLR Suppressorzellen generiert werden, die die Produktion von Autoantikörpern durch potentiell auto-aggressive B-Zellen regulieren, und deren Ausfall zur ungezügelten Produktion von Autoantikörpern führen würde. In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Rheumafaktoren und der erniedrigten AMLR (s. Abb.9),

ein Ergebnis, das der Arbeitshypothese von Sakane entgegensteht. Auch eine Korrelation der gefundenen AMLR-Aktivität zur klinischen Krankheitsaktivität, wie sie beim SLE berichtet wurde (14), konnte nicht hergestellt werden. Lediglich zur Medikation zeigt die AMLR in der durchgeführten Studie eine auffallende Beziehung. Patienten unter einer Basistherapie mit Gold zeigten gegenüber Gesunden keine erniedrigte AMLR (Tab. 7), auch wenn die Goldtherapie erst eine oder zwei Wochen vor dem Versuchstag begonnen worden war. Im Gegensatz zu Patienten ohne eine Basistherapie mit Gold war die gemessene AMLR signifikant erhöht. Wegen der bisher geringen Fallzahl bleibt diese Beobachtung noch genauer zu untersuchen. Kein sichtbarer Zusammenhang war zwischen der AMLR und der Therapie mit Cortico-Steroiden herzustellen, wenn auch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, daß die signifikante Erniedrigung der AMLR bei Patienten mit einer chronischen Arthritis zum Teil auch auf die Behandlung mit Cortico-Steroiden zurückgeht. In einer neuen Untersuchung war eine Abhängigkeit der AMLR von der in-vitro-Zugabe von Cortico-Steroiden gefunden worden (31).

Im Mittelpunkt der Diskussion über die Immunpathogenese der chronischen Arthritis des Menschen steht derzeit die Bildung von Rheumafaktoren und Rheumafaktor-Aggregaten. Dabei könnte die in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene verminderte AMLR als möglicher

zentraler immunregulativer Mechanismus mit Voraussetzung sein für eine unkontrollierte Bildung von Antiglobulinen, auch wenn mit den in der vorliegenden Studie angewandten Testmethoden keine Korrelation zwischen einer verminderten ALMR und dem Auftreten von Rheumafaktoren hergestellt werden konnte. Es wird weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen, das Phänomen der gestörten AMLR in seiner Bedeutung für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu klären.

5. Zusammenfassung

Die von Opelz et al. (8) und Weksler et al. (9) zuerst beschriebene "autologe Mixed Lymphocyte Reaction" (AMLR) wurde in den vorliegenden Experimenten erstmals bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) untersucht.

Lymphozyten aus peripherem Blut von 16 RA-Patienten und 17 gesunden Kontrollpersonen wurden durch Rosettierung mit Schafererythrozyten in eine "T"- und eine "Non-T"-Lymphozytenpopulation getrennt und eine "Einweg-MLC" zwischen mitomycinbehandelten Non-T-Lymphozyten als Stimulatorzellen und autologen T-Lymphozyten als Responderzellen angesetzt.

Dabei zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der AMLR bei RA-Patienten. Auch in der allogenen MLC war eine Beeinträchtigung der Non-T-Zellen von RA-Patienten als "Stimulatoren", nicht aber der T-Zellen als "Responder" zu sehen.

Beziehungen der erniedrigten AMLR zu Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer, klinischem Stadium, Entzündungsaktivität, Rheumafaktoren und Veränderungen der Lymphozyten-Oberflächenmarker konnten nicht gefunden werden. Auffällig war, daß fast alle RA-Patienten, deren AMLR den getesteten Kontrollpersonen gegenüber unverändert war, mit Gold behandelt worden waren.

Die erniedrigte AMLR bei RA-Patienten könnte mit einer verringerten Generation von Suppressorzellen einhergehen, dadurch für die ungezügelter Bildung von Autoantikörpern mitverantwortlich sein und somit eine Entgleisung der Immunregulation in vivo darstellen (14).

6. Literaturverzeichnis

- 1 Bain, B., Vas, M.R., Lowenstein, L.: A reaction between leukocytes in mixed peripheral blood cultures. Fed. Proc. 22, 428, 1963
- 2 Gordon, J.: The Mixed Leukocyte Culture Reaction. Med. Clin. of North America 56, No. 2, 337, 1972
- 3 Fridman, W.H., Kourilsky, F.M.: Stimulation of Lymphocytes by Autologous Leukaemic Cells in Acute Leukaemia. Nature 224, 277, 1969
- 4 Leventhal, B.G., Halterman, R.H., Herberman, R.B., Rosenberg, E.B.: Immune Reactivity of leukaemia patients to autologous blast cells. Cancer Res. 32, 1820, 1972
- 5 Green, S.S., Sell, K.W.: Mixed leukocyte stimulation of normal peripheral leukocytes by autologous lymphoblastoid cells. Science 170, 989, 1970
- 6 Birnbaum, G.G., Siskind, G.W., Weksler, M.E.: Auto-logous and allogeneic stimulation of peripheral human leukocytes. Cell. Immunol. 3, 44, 1972

- 7 Von Boehmer, H.: Selective stimulation by B lymphocytes in the syngeneic mixed lymphocyte reaction. Eur. J. Immunol. 4, 105, 1974
- 8 Opelz, G., Kuichi, M., Takasugi, M., Terasaki, P.I.: Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations. J. Exp. Med. 142, 1327, 1976
- 9 Kuntz, M.M., Innes, J.B., Weksler, M.E.: Lymphocyte transformation induced by autologous cells. IV. Human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or allogeneic non-T lymphocytes. J. Exp. Med. 143, 1042, 1976
- 10 Vande Stouwe, R.A., Kunkel, H.G., Halper, J.P., Weksler, M.E.: Autologous Mixed Lymphocyte Culture Reactions and Generation of Cytotoxic T cells. J. Exp. Med. 146, 1809, 1977
- 11 Sakane, T., Steinberg, A.D., Green, I.: Failure of autologous mixed lymphocyte reactions between T- and Non-T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, No. 7 3464, 1978
- 12 Stobo, J.D., Lochnan, C.P.: Proliferative reactivity of T cells to autologous cell associated antigens. Arthritis Rheum. 21 (Suppl.), 5210, 1978

- 13 Weksler, M.E., Kozak, R.: Lymphocyte transformation induced by autologous cells. V. Generation of immunologic memory and specificity during the autologous mixed lymphocyte reaction. J. Exp. Med. 146, 1833, 1977
- 14 Sakane, T., Steinberg, A.D., Arnett, F.C., Reinertsen, J.L., Green, I.: Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. III. Characterization of Lymphocyte Subpopulations Responsible for Defective Autologous Mixed Lymphocyte Reactions. Arthritis Rheum. 22, No. 7, 770, 1979
- 15 Burmester, G.R., Kalden, J.R., Peter, H.H., Schedel, J., Beck, P., Wittenborg, A.: Immunological and Functional Characteristics of Peripheral Blood and Synovial Fluid Lymphocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. Scand. J. Immunol. 7, 405, 1978
- 16 Kalden, J.R.: Lymphocyte Reactivity in Patients with Rheumatoid Arthritis (in Vorbereitung)
- 17 Kuntz, M.M.: Autologous mixed lymphocyte reactivity in patients with systemic lupus erythematosus or chronic lymphocytic leukaemia and in elderly patients. Clin. Res. 25, 642 A (Abstract), 1977

- 18 Kuntz,M.M., Innes,J.B., Weksler,M.E.: The cellular basis of the impaired autologous mixed lymphocyte reaction in patients with systemic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 63, 151, 1979
- 19 Peter,H.H., Pavie-Fischer,J., Fridman, W.H., Aubert,Ch., Cesarini,J.P., Roubin,R., Kourilsky,F.M.: Cell-mediated cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (IGR 3). J. Immunol. 115, No.2, 540, 1975
- 20 Böyum,A.: A one stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. Scand. J. clin. Lab. Invest. 21 (Suppl.97), 77, 1968
- 21 Galili,V., Schlesinger,M.: The formation of stable E-rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. J. Immunol. 112, 1628, 1974
- 22 Jondal,M., Holm,G., Wigzell,H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with SRBC. J. Exp. Med. 136, 207, 1972
- 23 Bach,F.H., Voynow,N.K.: One-way-Stimulation in Mixed Leukocyte Cultures. Science 153, 545, 1966

- 24 Sengar,D.P.S., Terasaki,P.I.: A semimicro mixed leukocyte culture test. Transpl. 11, 260, 1971
- 25 Kalden,J.R., Peter,H.H., Lohmann,E., Schedel,I., Diehl,V., Vallee: Estimation of T- and K-cell activity in the peripheral blood of sarcoidosis patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 278, 52, 1976
- 26 Weksler,M.E., Birnbaum,G.: Lymphocyte transformation induced by autologous cells: stimulation by cultured lymphoblast lines. J. Clin. Invest. 51, 3124, 1972
- 27 Junge,U., Hoekstra,J., Deinhardt,F.: Stimulation of peripheral lymphocytes by allogeneic and autochthonous mononucleosis lymphocyte cell lines. J. Immunol. 166, No. 5, 1306, 1971
- 28 Han,T., Moore,G.E., Sokal,J.E.: In vitro lymphocyte response to autologous cultured lymphoid cells. Proc. Spc. Exp. Biol. Med. 136, 976, 1971
- 29 Ponzio,N., Finke,J.H., Battisto,J.: Adult murine lymph node cells respond blastogenically to a new differentiation antigen on isologous and autologous B lymphocytes. J. Immunol. 114, 971, 1975

- 30 Schuurman,R.K.B., Gelfand,E.W., Matheson,D.,
Zimmerman,B., Dosch,H.M.: Identification of Ia on
a subpopulation of human T lymphocytes that stimu-
late in a mixed lymphocyte reaction.
J. Immunol. 124, No. 4, 1924, 1980
- 31 Ilfeld,D.N., Krakauer,R.S., Blaese,R.M.:
Suppression of the human autologous mixed lympho-
cyte reaction by physiologic concentrations of
hydrocortisone. J. Immunol. 119, No. 2, 428, 1977
- 32 Hausman,P.B., Stobo,J.D.: Specificity and function
of a human autologous reactive T cell.
J. Exp. Med. 149, 1537, 1979
- 33 Miller,R.A., Kaplan,H.S.: Generation of cytotoxic
lymphocytes in the autologous mixed lymphocyte
culture. J. Immunol. 121, No. 6, 2165, 1978
- 34 Tomonari,K.: Cytotoxic T cells generated in the
autologous mixed lymphocyte reaction. I. Primary
AMLR. J. Immunol. 124, No. 3, 1111, 1980
- 35 Fitzharris,P., Iliescu,V., Knight,R.: Suppressor
cell generation in the autologous MLR. 4th Con-
gress of Immunology, Paris, 4.4.11 (Abstract), 1980

- 36 Smith,J.B., Knowlton,R.P.: Activation of suppressor T cells in human autologous mixed lymphocyte culture. J. Immunol. 123, No. 1, 419, 1979
- 37 Innes,J.B., Kuntz,M.M., Young,T.K., Weksler,M.E.: Induction of suppressor activity in the autologous mixed lymphocyte reaction and in culture with Concanavalin A. J. Clin. Invest. 64, 1608, 1979
- 38 Sakane,T., Green,I.: Specificity and suppressor function of human T cells responsive to autologous non-T cells. J. Immunol. 138, No. 3, 584, 1979
- 39 Palacios,R., Llorente,L., Alarcón-Segovia,D., Ruiz-Arguelles,A., Díaz-Jouanen,E.: Autologous rosette-forming T cells as the responding cells in human autologous mixed lymphocyte reaction. J. Clin. Invest. 65, 1527, 1980
- 40 Wolos,J.A., Davey,F.R.: Function of lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukaemia. Cancer 45, 893, 1980
- 41 Smith,J.B.: Stimulation of autologous and allogeneic human T cells by B cells occurs through separate B cell antigen systems. Cell. Immunol. 36, 203, 1978

- 42 Fink,U., Peterson,P.A., Reichert,A., Födinger,A.M.,
Huber,C.: Ia-like antigens associated with normal
and neoplastic non-T cells induce autologous T lym-
phocyte proliferation. Immunobiology, Z. f. Immuni-
tätsforschung 156, No. 3, 245 (Abstract), 1979
- 43 Bach,F.H., Bach,M.L., Sondel,P.M.: Differential
function of major histocompatibility complex anti-
gens in T-lymphocyte activation.
Nature 259, 273, 1976
- 44 Smith,J.B., Knowlton,R.P., Koons,L.S.: Immunological
studies in chronic lymphocytic leukaemia: defective
stimulation of T cell proliferation in autologous
mixed lymphocyte culture.
J. Natl. Cancer Inst. 58, 579, 1977
- 45 Kuntz,M.M., Innes,J.B., Weksler,M.E.: Impaired
immune surveillance in chronic lymphocytic leuk-
aemia and systemic lupus erythematosus.
Clin. Res. 24, 448 A, 1976
- 46 Stobo,J.D., Lochnan,C.P.
Mayo Clin. Proc. 51, 479, 1976
- 47 Smith,J.B., Pasternak,R.D.: Syngeneic mixed lymphi-
cyte reaction in mice: Strain distribution, kinetics,
participating cells and absence in NZB mice.
J. Immunol. 121, 1889, 1978

- 48 Abdou,N.I., Sagawa,A., Pascual,E., Hebert,J.,
Sadeghee,S.: Suppressor T-cell abnormality in idio-
pathic systemic lupus erythematosus. Clin. Immu-
nol. Immunopathol. 6, 192, 1976
- 49 Breshnihan,B., Jasin,H.E.: Suppressor function of
peripheral blood mononuclear cells in normal indi-
viduals and in patients with systemic lupus erythe-
matosus. J. Clin. Invest. 59, 106, 1977
- 50 Horwitz,S., Borcharding,W., Moorthy,A.V., Chesney,
R., Schulte-Wissermann,H., Hong,R., Goldstein,A.:
Induction of suppressor T cells in systemic lupus
erythematosus by thymosin and cultured thymic
epithelium. Science 197, 999, 1977
- 51 Sakane,T., Steinberg,A.D., Green,I.: Studies on
immune functions of patients with systemic lupus
erythematosus. I. Dysfunction of suppressor T cell
activity related to impaired generation of, rather
than response to, suppressor cells.
Arthritis Rheum. 21, 657, 1978
- 52 Oldstone, M.B.A., Tiskon,A., Moretta,L.: Active
thymus derived suppressor lymphocytes in human
cord blood. Nature 269, 333, 1977

- 53 Ahmann,G.B., Sachs,D.H., Hodes,R.J.: Requirement
for an Ia-bearing accessory cell in Con A-induced
T cell proliferation. J. Immunol. 117, 2171, 1976

Danksagung

Ohne die Mitwirkung der Patienten und der gesunden Blutspender wäre diese Untersuchung nicht zustande gekommen. Frau E. Hahn-Deinstrop, Frau H. Leowald, Herr B. Büssenschütt und meine Frau Cordula haben mich tatkräftig unterstützt. Ihnen allen herzlichen Dank, vor allem aber Herrn Prof. Kalden für seine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 27. April 1955 wurde ich, Ottmar Leidner, als Sohn des Landwirtschaftsberaters Ottmar Leidner und seiner Frau Annemarie, geb. Mehringer, in Kötzing, Kreis Cham, geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule Kötzing, ab 1965 das Humanistische Gymnasium der Benediktiner in Metten, wo ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Im selben Jahr begann ich das Studium der Medizin an der Universität Regensburg; von dort wechselte ich nach der Ärztlichen Vorprüfung an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Am Institut mit Poliklinik für klinische Immunologie der Universität begann ich im April 1978 mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation. Im August 1980 heiratete ich die Studentin Cordula Schindler.

Zur Zeit lege ich den 3. Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Ottmar Leidner

